

5. Сагач В.Ф., Ткаченко М.Н., Дмитриева А.В. О роли эндотелия в реакции реактивной гиперемии коронарных сосудов // ДАН. – 1989. – Том 307, № 3. – С. 765-767.

6. Солодков А.П., Божко А.П., Шебеко В.И. и др. Ауторегуляция коронарного тока изолированного сердца крыс после блокады NO-синтазы // Бюлл. экспериментальной биологии и медицины. – 1993. – № 9. – С. 242-244.

РЕАКЦИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ СИНТЕЗА NO КОРОНАРНЫХ СОСУДОВ У КРЫС С РАЗЛИЧНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К СТРЕССУ

Солодков А.П., Щербинин И.Ю.

Витебский государственный медицинский университет, Витебск

Наряду с разработкой подходов к определению функционального состояния эндотелия, как одно из направлений, можно рассматривать исследование последствий воздействия шокоподобного стресса на его NO-продуцирующую функцию у животных, имеющих различную степень стресс чувствительности. Несмотря на большое количество публикаций [8], посвященных вопросу индивидуальной чувствительности к стрессу, функция сосудов сердца остается малоизученной. Более того, практически, отсутствует информация о роли и механизме обусловленных стрессом изменений эндотелиальной системы синтеза NO в сосудах сердца у животных с разными индивидуально-типологическими особенностями поведения. Данный вопрос и стал предметом исследований.

Материалы и методы исследований

Опыты проводили на беспородных белых крысах массой 170-280 г, которых в тесте “открытое поле” разделяли на животных с высокой (“активные”) и низкой (“пассивные”) двигательной и поисково-ориентировочной реакцией. Коронарный поток и сократительную функцию миокарда изучали на препаратах изолированного сердца, перфузируемого в условиях постоянного давления или потока. Перфузию проводили раствором Кребса-Хензеляйта (рН - 7.3-7.4), обогащенным карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂). В ходе опыта перфузионное давление (ПД) ступенчато повышали от 40 до 120 мм рт.ст. (коронарная ауторегуляция). Степень изменения коронарного потока по мере увеличения ПД, оценивали по индексу ауторегуляции, предложенному Е.Б.Новиковой (1972). Коронарный расширительный резерв (КРР) определяли при каждом значении ПД, как отношение максимального гиперемического

коронарного потока, развивающегося после 60-секундного прекращения перфузии, к исходному. С целью определения сократительной функции миокарда в полость левого желудочка вводили латексный баллончик постоянного объема. Давление в латексном баллончике регистрировали с помощью электроманометра. В изолированном сердце, перфузируемом в условиях постоянного расхода, о тонусе сосудов сердца судили по изменению ПД. Стресс вызывали фиксацией крыс на спине в течение 6 часов. Уровень базального высвобождения NO эндотелием коронарных сосудов оценивали (1) по величине изменения объемной скорости коронарного потока после добавления в перфузионную жидкость конкурентного блокатора синтеза NO L-NAME (Sigma, USA), - 60 μ M, а также (2) по выраженности обусловленного напряжением сдвига (shear stress) эндотелиоцитов, зависимо от NO изменения коронарного ПД, индуцируемого резким увеличением объемной скорости коронарного потока от 4.0 до 20.0 мл/мин.

Интенсивность перекисного окисления липидов оценивали по содержанию в плазме крови диеновых конъюгатов и ТБК активных продуктов. Активность ферментов антиоксидантной защиты: супероксиддисмутазу и каталазу, - определяли в ткани аорты и миокарда по методу Beauchamp C., Fridovich J. (1971) и Корольюк М.А. и др. (1988). Концентрацию трийодтиронина (СТЗ) и кортикостероидную активность сыворотки крови определяли радиоиммунологическим методом при помощи наборов Института биохимической химии (г.Минск).

Материалы обработаны статистически на компьютере IBM/PC с использованием критерия Стьюдента.

Результаты исследований

Наиболее выраженная ауторегуляция коронарного потока (способность сосудов сердца поддерживать поток постоянным или близким к постоянному, несмотря на изменение ПД) в контрольных группах "активных" и "пассивных" животных наблюдалась, начиная с ПД 60 мм рт. ст. Объемная скорость коронарного потока (ОСКП), индекс ауторегуляции, отражающий способность коронарных сосудов суживаться в ответ на увеличение ПД, а также сократительная активность миокарда левого желудочка в изолированных сердцах "активных" и "пассивных" животных не различались. После перенесенной иммобилизации изменения коронарного кровообращения наблюдались только в группе "пассивных" крыс. Выявленная ауторегуляция коронарного потока в этой группе животных прослеживалась с более высокого, чем до стресса, уровня ПД (80 мм рт.ст.). Следовательно, нижний предел ПД, с которого ОСКП начинал пассивно следовать за артериальным давлением повышался, что способно значительно ограничивать приспособительные возможности коронарного кровообращения "пассивных" крыс, особенно в условиях низкого системного артериального давления, которое характерно для

данного состояния [6,7]. В сердцах "пассивных" крыс под влиянием иммобилизации ОСКП увеличивалась на 38,8%, индекс ауторегуляции уменьшался на 23% , что может свидетельствовать об ослаблении способности гладкой мышцы коронарных сосудов отвечать сокращением в ответ на ее растяжение (табл.).

Таблица

Влияние L-NAME на объемную скорость коронарного потока изолированного сердца крыс, имеющих различный тип поведения в тесте "открытое поле" и перенесших иммобилизационный стресс

Показатель	Группа животных	Перфузионное давление, мм рт.ст.				
		40	60	80	100	120
Объемная скорость кровотока, мл/мин	Контроль "пассивные"	7,2±0,24	12,5±0,52	13,2±0,41	13,6±0,37	13,78±0,41
	Контроль "активные"	7,8±0,6	12,8±0,78	13,6±0,68	14,1±0,54	14,2±0,63
	Контроль "пассивные" +NAME	6,5±0,47	7±0,5	7,3±0,47	7,9±0,6	8,1±0,67
	Контроль "активные" +NAME	7,05±0,49	7,35±0,43	7,87±0,47	8,1±0,45	8,6±0,49
	Стресс "пассивные"	10± 0,8*	16,3± 1,07*	18± 1,74*	19,8±2,1*	21,5±1,89*
	Стресс "активные"	9,54±0,53	14,58±0,72	15,24±0,72	15,6±0,72	16,32±0,72*
	Стресс "пассивные" +NAME	5,7±0,46	7,28±0,56	7,88±0,56	8,91±0,68	9,4±0,86
	Стресс "активные" +NAME	7,2±0,68	8,05±0,86	8,7±0,69	9,08±0,63	9,58±0,68

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к соответствующему контролю.

Максимальный гиперемический поток не изменялся и КРР уменьшался на 29,5% в связи с увеличением исходного коронарного потока. На фоне увеличения ОСКП происходило снижение развиваемого внутрижелудочкового давления на 45,5%, то есть развивалась диссоциация

между величиной коронарного потока и сократительной активностью миокарда.

Обработка L-NAME изолированного сердца "пассивных" крыс, перенесших стресс, оказало значительно больший эффект, чем до стресса или в сердце активных крыс и практически полностью устраняла постстрессорное увеличение ОСКП. Воздействие блокатора на ОСКП "активных" крыс, перенесших стресс, было таким же как и до стресса. Этот факт свидетельствует о возрастании под влиянием иммобилизационного стресса базальной продукции NO только в эндотелии коронарных сосудов "пассивных" крыс, а также о его важной роли в механизме, вызываемых стрессом изменений тонуса сосудов сердца, в этой группе животных.

С целью выяснения особенности базального синтеза NO эндотелием коронарных сосудов "активных" и "пассивных" крыс на следующем этапе исследовали один из фундаментальных механизмов, определяющий базальную продукцию NO, индуцируемую потоком, зависимую от увеличения напряжения сдвига активацию продукции NO. Процент снижения коронарного ПД, обусловленный возрастанием напряжения сдвига эндотелиоцитов в коронарном сосудистом русле "активных" крыс ($16,2 \pm 2,9\%$) не отличался от "пассивных" ($15,7 \pm 3,1\%$, $p > 0,05$). Индуцированная потоком дилатация коронарных сосудов в группе "пассивных" крыс под влиянием иммобилизационного стресса возрастала до $25,3\%$ ($p < 0,05$), а у "активных" не увеличивалась ($20,3 \pm 3,7$, $p > 0,05$).

Следовательно, (1) у "пассивных" животных соответственно вызываемому стрессом увеличению базальной продукции NO и снижению тонуса сосудов сердца по сравнению с "активными" крысами наблюдалось увеличение индуцированной потоком дилатации коронарных сосудов; (2) в сердцах "активных" крыс не выявлялось постстрессорного снижения тонуса сосудов сердца и не наблюдалась характерная для стресса активация базальной продукции NO, а также отсутствовало вызванное увеличением напряжения сдвига возрастание высвобождения-синтеза NO.

Таким образом, только у крыс с низкой двигательной активностью под влиянием стресса выявляется вызываемая увеличением напряжения сдвига активация эндотелиальной системы L-аргинин-NO [9].

Учитывая, что интенсивность свободно-радикального окисления имеет существенное значение в определении активности системы L-аргинин-NO, на следующем этапе исследовали его интенсивность в плазме крови крыс, имеющих высокую и низкую поисково-ориентировочную и двигательную реакцию. Концентрация диеновых конъюгатов в плазме "активных" крыс составила $0,47 \pm 0,1$ нМ/мл, МДА – $5,6 \pm 0,6$ нМ/мл что было на 160% и 48,5% больше, чем у "пассивных" ($0,18 \pm 0,03$ нМ/мл и $3,7 \pm 0,4$ нМ/мл, соответственно). Активность супероксиддисмутазы (СОД) в аорте ($68,9 \pm 19,7$ Ед/г х мин) "активных" крыс оказалось достоверно выше

на 93%, чем у "пассивных" ($133,6 \pm 8,3$ Ед/г х мин). В то же время, активность данного фермента антиоксидантной защиты в клетках миокарда не различалась у крыс с различной двигательной активностью. В ткани аорты и миокарда "активных" животных активность каталазы была на 21% и 34% ниже, чем у "пассивных" ($1,81 \pm 0,15 \mu\text{M/л.г х мин}$ и $1,51 \pm 0,12 \mu\text{M/л.г х мин}$, против $2,27 \pm 0,19 \mu\text{M/л.г х мин}$ $p < 0,05$ и $2,31 \pm 0,45 \mu\text{M/л.г х мин}$, $p < 0,05$ соответственно). В сосудистой стенке "активных" крыс под влиянием стресса активность СОД не изменялась, но на 61%; снижалась активность каталазы; в миокарде активность СОД не изменялась, а каталазы снижалась на 37%. В группе "пассивных" крыс, перенесших стресс, активность СОД и каталазы в стенке аорты снижалась более, чем в 2.5 раза и на 67% соответственно; в миокарде животных этой группы наблюдалось только снижение активности каталазы на 78%. Таким образом, у активных животных до стресса выраженность свободно-радикального окисления была выше, а активность СОД и каталазы в аорте и только каталазы в миокарде оказалась более низкой, чем у "пассивных" крыс. Большей чувствительностью к действию стресса обладала каталаза, активность которой уменьшилась в миокарде и аорте в обеих группах.

Более высокая активность свободно-радикального окисления у активных животных сопровождалась в 2 раза большим потреблением кислорода (746 ± 53 мл/кг.час) по сравнению с "пассивными" крысами (373 ± 52 мл/кг.час). У "активных" животных на фоне интенсивного потребления кислорода и выраженной активности свободно-радикального окисления в плазме крови обнаружилась более высокая концентрация триодтиронина ("активные" $1,33 \pm 0,16$ нМ, "пассивные" $0,51 \pm 0,13$ нМ) и не отличающаяся кортикостероидная активность, по сравнению с "пассивными" животными ("активные" $28,8 \pm 5,4$ нМ, "пассивные" $38,4 \pm 6,4$ нМ).

Обсуждение

Впервые показано, что ауторегуляция коронарного кровотока оказывается наиболее уязвимой к действию шокopodobного стресса у животных, проявляющих в тесте "открытое поле" "пассивный" тип поведенческой реакции, и устойчивой у животных с активным типом поведения, во вторых, продукция NO и NO-зависимая регуляция сосудистого тонуса существенным образом отличается у крыс с различной двигательной активностью в ответ на действие стрессора; в третьих, базальная и стимулированная NO-зависимая регуляция сосудистого тонуса может определяться различной интенсивностью метаболизма у этих крыс, в частности, различным уровнем потребления кислорода и образования свободных радикалов кислорода, а также активностью антиоксидантных ферментов. Анализируя результаты, необходимо подчеркнуть, что, как это наблюдалось нами ранее [1,4,5], иммобилизационный стресс приводил к

увеличению коронарного потока на фоне уменьшения внутрижелудочкового давления, то есть к снижению эффективности коронарного кровообращения, уменьшению способности сосудов сердца к ауторегуляции и снижению КРР. Однако это прослеживалось только у "пассивных" чувствительных к стрессу крыс и практически отсутствовало у устойчивых "активных" животных. Следовательно, в отличие от крыс с выраженной двигательной активностью в изолированных сердцах "пассивных" животных наблюдалась абсолютная и относительная гиперперфузия миокарда. Полученные результаты свидетельствуют о том, что под влиянием стресса у животных с "пассивным" типом поведения наблюдается активация эндотелиоцитов коронарных сосудов и, в частности, их системы синтеза NO. Эти изменения, как видно, играют важную роль в снижении тонуса коронарных сосудов, увеличении ОСКП, угнетении коронарной ауторегуляции, КРР и в возникновении диссоциации между потребностью миокарда в кровоснабжении и его обеспеченностью [4].

Разная чувствительность коронарных сосудов и миокарда крыс к воздействию стресса может определяться генетически детерминированными особенностями их фенотипа. В пользу данного предположения свидетельствует то, что у "активных" животных, по сравнению с "пассивными", активность перекисного окисления липидов, потребление кислорода, а также содержание ТЗ выше, чем у "пассивных". Кроме того, у "активных" животных активность антиоксидантных ферментов (СОД и каталаза) ниже, чем у "пассивных". Следовательно, мембранные и внутриклеточные белки "активных" крыс будут подвержены существенно большему влиянию свободных радикалов, чем у "пассивных" животных. Свободные радикалы способны выполнять функцию вторичных посредников в процессе передачи внутриклеточного сигнала, а также оказывать существенное влияние на механизмы его передачи. Следовательно, вполне вероятно, что высокое содержание свободных радикалов, изменяя редокс состояние системы глутатиона и тиоредоксина [10], способно модифицировать активность генома и принимать участие в формировании фенотипа гладкомышечных и эндотелиальных клеток характерного для "активных" крыс. Высокая активность ПОЛ у "активных" крыс может приводить к модификации белков эндотелиальных мембран, в том числе и кальциевых каналов. В результате этого, мембраны эндотелиоцитов "активных" крыс, вероятно, становятся более проницаемыми для ионов кальция. Поскольку активность эндотелиальной конституциональной NO-синтазы зависит от содержания кальция внутри клетки, то у животных этой группы, вполне вероятно, основным фактором, определяющим интенсивность базальной продукции NO, является достаточно высокая концентрация внутриклеточного кальция. Если это так, то более высокое внутриклеточное содержание

кальция может быть "тренирующим фактором" для эндотелиоцитозов "активных" крыс, что и проявляется слабо выраженной ответной реакцией их коронарного эндотелия при стрессе.

Более того, у "активных" крыс может быть существенно повышено образование пероксинитрита, который в физиологических концентрациях, вероятно, действует на те же молекулярные мишени в эндотелиоцитах и гладкомышечных клетках как и NO. В зависимости от концентрации пероксинитрита в клетке возможно существование конкуренции между NO и ONOO в реакциях взаимодействия со сходными мишенями. Не решенным остается вопрос - как отличаются свойства эндотелиоцитов в физиологических условиях при различной продукции пероксинитрита?

Обращает на себя внимание факт, что у "активных" животных до стресса индуцированная потоком дилатация коронарных сосудов не отличается от таковой у "пассивных" и не достоверно изменяется под влиянием стресса. Следовательно, по неясным причинам постстрессорная активация эндотелия коронарных сосудов не наблюдается. Это также позволяет сравнить состояние эндотелия сосудов сердца крыс, обладающих выраженной двигательной активностью, с эндотелием животных адаптированных к стрессу[2,4].

В состоянии покоя у "пассивных" животных эндотелиальная система L-аргинин-NO является одной из наиболее значимых в локальной регуляции коронарного потока. Кроме того, в этой группе крыс, наблюдается значительный прирост образования NO при стрессорной активации эндотелия, сопровождающийся развитием гипотензии [5] и нарушением ауторегуляции коронарного потока. Подобная роль NO в формировании ответа коронарных сосудов при стрессе у "пассивных" крыс может быть связана с меньшей интенсивностью свободно-радикального окисления и потребления кислорода организмом животного. Поскольку интенсивность свободно-радикального окисления является одним из факторов, определяющих внутриклеточное содержание кальция, можно предположить, что в эндотелиоцитах и других клетках сосудистой стенки "пассивных" крыс содержание кальция ниже, чем у "активных" животных. Ding Y., и Vaziri N. в 1998 году показали, что после уменьшения внутриэндотелиальной концентрации ионов кальция происходит активация синтеза мРНК конституциональной NO-синтазы и увеличивается образование продуктов деградации NO (нитратов/нитритов). Следовательно, можно предположить, что, благодаря особенностям нейрогуморальной регуляции, в эндотелиоцитах "пассивных" крыс при значительных резервных возможностях NO-синтазы, активность ее до стресса не высокая. В отличие от этого, в эндотелии "активных" крыс, по-видимому, резерв активности NO-синтазы исчерпан уже в базальных условиях. Таким образом, эндотелиоцитарная система L-аргинин-NO у "пассивных" крыс будет более чувствительна к

характерному для стресса возрастанию внутриклеточного кальция. Это создает все предпосылки для того, чтобы активация эндотелия при стрессе оказалась неоправданно высокой, а продукция NO соответствовала термину гиперпродукция. Исходя из этого предположения, можно понять, почему гиперпродукция эндотелиального NO будет развиваться только у "пассивных" крыс и, в принципе, невозможна в эндотелии "активных" животных. Таким образом, генетически детерминированные особенности нейрогуморальной регуляции и механизмов активации синтеза NO создают условия, определяющие чувствительность эндотелиоцитов к их стрессорной активации. В заключении необходимо отметить, что проведение дальнейших исследований может внести вклад в понимание того, каким образом в зависимости от исходного фенотипа клетки, различные раздражители интегрируются эндотелием и превращаются в его биологический ответ, и как их взаимодействие будет протекать при развитии патологических процессов в организмах, имеющих различную чувствительность к стрессу.

ЛИТЕРАТУРА

- 1.Божко А.П., Солодков А.П. Ауторегуляция и расширительный резерв коронарных сосудов при ограничении подвижности крыс // Физиол.журн.СССР им. И.М. Сеченова.1989. Т.75, N4. С.522528
- 2.Влияние адаптации к физической нагрузке на эндотелийзависимые реакции изолированных сосудов на продукцию NO у крыс / Е.Б. Манухина, А.В. Лапшин, Ф.З. Меерсон, И.Ю. Малышев // Физиол. журн. им. И.М.Сеченова. 1996. Т.82, N 7. С.5460.
- 3.Новикова Е.Б. Об ауторегуляции в коронарной системе // Физиол. журн. СССР им. И.М. Сеченова. 1972.Т.58, N 1. С. 6172.
- 4.Солодков А.П. Стрессорные изменения функции коронарных сосудов интактного и гипертрофированного сердца и тиреоидные гормоны: Автореф.дисс. ... канд. мед. наук: 14.00.17 / Институт нормальной физиологии АН РБ. Минск, 1991.24с.
- 5.Солодков А.П., Божко А.П. Влияние эндогенных метаболитов на ауторегуляцию и расширительный резерв коронарных сосудов // Бюлл. экспер. биол. и мед. 1993. N5. С. 456458.
- 6.Солодков А.П., Божко А.П. К механизму влияния малых доз тиреоидных гормонов на стрессорные изменения тонуса сосудов // Физиол. журн. им.И.М.Сеченова.1995. Т.81.12. С.95100.
- 7.Солодков А.П., Божко А.П. К механизму стрессорного угнетения сократительной функции и реактивности гладкой мышцы // Физиол. журн. им. И.М.Сеченова.1996. Т.82, N 7. С.4653.
- 8.Судаков К.В. Индивидуальная устойчивость к стрессу. Москва, 1998.267с.

9.Щербинин И. Ю. Стресс индуцированные изменения эндотелийзависимой дилатации коронарных сосудов в зависимости от особенностей поведения в эксперименте.// Дисфункция эндотелия. Витебск 2000 г. С728

10.Ding Y., и Vaziri N. Calcium channel blockade enhances nitric oxide synthase expression by cultured endothelial cells // Hypertension. 1998.Vol. 32.P. 718723.

11.Nakamura H., Nakamura K., Yodoi J. // Annu. Rev. Immunol. 1997. V.15. P. 351369.

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ЭКВИВАЛЕНТЫ МЕМБРАН ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

Шахламов В.А.

НИИ морфологии человека РАМН, Москва

Патологическое состояние клетки отражается на ее мембране. При встрече эндотелиальных клеток с вредными агентами (биологическими, химическими, физическими) изменяется, прежде всего, молекулярное строение плазмалеммы, которая получает с помощью специфических рецепторов информацию о начале действия вредного агента. При электронно-микроскопическом исследовании такой плазмалеммы эндотелиоцита в условиях эксперимента или патологии одним из проявлений патологического состояния плазмалеммы является изменение ее конфигурации. В некоторых случаях изменение конфигурации плазмалеммы эндотелиоцита в какой-то степени может быть связано с изменением ее ригидности. Участок плазмалеммы, потерявший свою ригидность, может легко смещаться током внутриклеточной жидкости, который усиливается или замедляется при той или иной патологии. Говоря о ригидности плазмалеммы эндотелиоцита, уместно упомянуть, что она связана с содержанием холестерина в ней, а также от фосфолипидов, которые, как и во всех мембранах живых клеток могут находиться выше или ниже температуры их фазового перехода. Находясь ниже температуры их фазового перехода, углеводородные цепи фосфолипидов будут относительно ригидными или гелеподобными. При таком расположении молекулы холестерина оказывают «разжижающее» действие, способствующее усиленному движению ацильных цепей. Когда же фосфолипиды находятся выше температуры перехода, стероидное ядро мешает изгибанию углеводородных цепей, и тогда уменьшается текучесть плазмалеммы. Вполне возможно, что холестерин играет двоякую роль в